



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-019285

(43)Date of publication of application : 21.01.1997

(51)Int.Cl.

C12N 5/04
A01H 4/00

(21)Application number : 07-192615

(71)Applicant : NISSHINBO IND INC
MITSUBISHI CHEM CORP

(22)Date of filing : 06.07.1995

(72)Inventor : SATOU TAKAYA
TAKAHASHI NORIMITSU

(54) PLANT TISSUE CULTURE MEDIUM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject culture medium by using a porous composition of cellulose such as a cellulose, cyanoethylated cellulose and its hydrolyzate, continuously usable from multiplication to acclimatization and raising of seedling, excellent in growing and rooting, having a high percentage of rootage.

SOLUTION: A kraft pulp of a needle leaved tree is immersed in an alkali, compressed, ground, aged at 70° C for 3 hours, reacted with carbon disulfide and made into cellulose xanthate, which is dissolved in an aqueous solution of sodium hydroxide to give a viscose. Then, the viscose is mixed with a reinforcing cellulose fiber, optionally blended with acrylonitrile and cyanoethylated, molded and neutralized to give a porous material. The porous material is optionally brought into contact with an acid or an alkali and the cyanoethyl group is partially hydrolyzed to give the objective plant tissue culture medium which comprises a cellulose, cyanoethylated cellulose, its hydrolyzate, etc., and has 0.02-0.3g/ml apparent density and 20μm to 5mm average particle diameter.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 28.03.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-19285

(43)公開日 平成9年(1997)1月21日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/04		9281-4B	C 1 2 N 5/00	F
A 0 1 H 4/00			A 0 1 H 4/00	

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平7-192615	(71)出願人	000004374 日清紡績株式会社 東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号
(22)出願日	平成7年(1995)7月6日	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
		(72)発明者	佐藤 貴哉 東京都足立区西新井栄町一丁目18番1号 日清紡績株式会社東京研究センター内
		(72)発明者	高橋 宣光 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 一 (外2名)

(54)【発明の名称】 植物組織培養培地

(57)【要約】

【課題】 組織培養植物の増殖から順化、成苗に至るまで連続して使用できる培地資材を提供すること。

【解決手段】 セルロース、シアノエチル化セルロース及びその加水分解物から選ばれるセルロース類の多孔体からなる植物組織培養培地。

【特許請求の範囲】

【請求項1】セルロース、シアノエチル化セルロース及びその加水分解物から選ばれるセルロース類の多孔体からなる植物組織培養培地。

【請求項2】セルロース類の多孔体の、見掛け密度が0.02～0.3g/mlで、平均孔径が20μm～5mmであることを特徴とする請求項1記載の植物組織培養培地。

【請求項3】セルロース類が、セルロースであることを特徴とする請求項1又は2記載の植物組織培養培地。

【請求項4】セルロース類が、シアノエチル基としての窒素分を0.1重量%～2重量%未満含有している、シアノエチル化セルロースであることを特徴とする請求項1又は2記載の植物組織培養培地。

【請求項5】セルロース類が、シアノエチル化セルロースを酸又はアルカリと接触させて、シアノエチル基の少なくとも一部を、カルバモイルエチル基、カルボキシエチル基又はその塩の基に加水分解したものであることを特徴とする請求項1又は2記載の植物組織培養培地。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、植物組織培養の増殖から順化、成苗まで連続して使用できる、新規な増殖順化用植物組織培養培地に関するものである。

【0002】

【従来の技術】高等植物の細胞培養や成長点培養においては、初代培養、継代培養を行い、早生分枝法、プロトコーム様体法、苗条原基法等により小植物や多芽体を形成させ、次に苗化培養を行う。この苗化培養段階では、早生分枝、プロトコーム様体、苗条原基等は茎葉体を生長させ、ついで不定根が分化してくる。この苗化培養においては、培地が植物の生長、発根にとって重要な要素である。

【0003】このような植物培養においては、培地材として寒天が最も一般的に使われている。しかし、寒天を用いた場合は培地内に空気が入らないので、発根が悪い欠点がある。また、特殊な発根用寒天培地で発根をよくしても、出てきた根が有効に働かず直接栽培用土に移植すると地上部が枯れてしまう問題点がある。それゆえ、パーライトやバーミキュライト等の培地で順化させた後、露地あるいは温室内の土壌に移植する方法が採られているが、順化過程には通常1～3ヶ月の長期間を要し、また、順化期間中に活着が悪く培養苗が枯死したり苗質が水浸状のまま正常な形にならず、手間や歩留りの点で問題点が多い。さらに、寒天のかわりにロックウールを培地として使用することもあるが、栽培用土に移植する際に、ロックウール自体が分解せず残ってしまう問題があり、また、根から分離しようとする、根を傷め活着率低下の原因となり問題が残る。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、従来技術では植物組織培養により成苗を得ようとする場合、培養体からの発根が悪く、初期生育も悪く、活着率の低さにより歩留りの点で問題があった。本発明は、このような問題点を鑑みてなされたものである。すなわち、本発明の目的は、組織培養植物の増殖から順化、成苗に至るまで連続して使用できる培地資材を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明の特徴は、セルロース類の多孔体を植物組織培養培地に用いることにある。さらには、シアノエチル基としての窒素分を0.1重量%以上2重量%未満含有するシアノエチル化セルロースの多孔体を植物組織培養培地として用いることにある。また、さらには、シアノエチル基を酸あるいはアルカリで処理し、シアノエチル基の少なくとも一部を、カルバモイルエチル基、カルボキシエチル基、カルボキシエチル塩の基に加水分解したセルロース誘導体からなる多孔体を植物組織培養培地として用いることにある。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を詳しく説明する。本発明に用いるセルロース類の多孔体とは、一般にセルローススポンジとして知られるものを含み、セルロース、シアノエチル化セルロース及びその加水分解物から選ばれるセルロース類を素材とし、これがスポンジ状に加工されたものである。用いるセルロース類の多孔体の見掛け密度は、0.02～0.3(g乾燥重量/ml湿潤時体積)が好ましい。見掛け密度が、大きすぎると、空隙率が低く硬い多孔体となって、植物体の生育の妨げとなる。また、小さすぎると、空隙率が高く多孔体壁が薄くかつ少なくなって、多孔体の強度が低下する欠点がある。また、平均孔径の好ましい範囲は、20μm～5mm程度である。平均孔径が、大きすぎると、表面積が低下し、孔内に水を蓄える能力が低下して、植物細胞への栄養の供給に支障が生じる。また、小さすぎると、緻密で硬い多孔体となり、植物細胞の生育には適さない。

【0007】本発明において、セルロース類の多孔体の見掛け密度の測定法は、特願平6-54787号明細書に開示されている。すなわち、湿潤状態の多孔体及び必要な器具として、容量100ml、栓付のメスフラスコと1mg単位まで測れる秤を準備し、次の操作を行う。湿潤状態の多孔体は、乾燥状態の多孔体を、水面に浮遊又は水面下に沈めた状態で、アスピレーターにより脱気し、完全に水で膨潤させて準備する。

1 メスフラスコと栓を乾燥して、その質量(A)を測る。

2 メスフラスコに、水を満たして栓をする。この際、気泡がメスフラスコ内に残らないようにする。外部を拭き、乾かした後、質量(B)を測る。

3 水を捨て、メスフラスコを乾燥させる。前記湿潤状態の多孔体（サンプリングは、できるだけランダムに）を、軽く水を切った後、圧力を加えないで、メスフラスコの標線付近まで入れて、栓をして、質量（C）を測る。

4 次に、メスフラスコ内に水を加え、気泡を除いた後、さらに水で満たし栓をする。外部を拭き、乾かした後、質量（D）を測る。

5 さらに、メスフラスコから取出した全量の多孔体を、105℃で12時間乾燥した後、質量（E）を測る。

見掛け密度（g乾燥重量／ml湿潤時体積）は、次の計算式に従って算出される。

$$\text{見掛け密度} = E / [(B - A) - (D - C)]$$

なお、この値を小数点以下3桁まで算出し、しかも3回のサンプリングを行い、得られた3つの値の平均値で表示する。

【0008】また、本発明において、多孔体の平均孔径の測定は、走査型電子顕微鏡観察によって行う。すなわち、多孔体を鋭利な刃物で切断し、その切断面を走査型電子顕微鏡を用いて写真撮影する。撮影に際しては、スケールも同時に写真に写し込んでおく。一枚の写真に撮影された、孔20個を無作為に抽出し、スケールを用いて、その直径を測定する。一種の多孔体について、断面写真10枚を撮影し、全部で200個の孔の直径の測定値の平均をもって、平均孔径とする。

【0009】本発明に用いるセルロース類の多孔体の製造法は特に限定されないが、好ましくは、ビスコースに多孔化剤と補強繊維を加え、固化、再生した後、多孔化剤を水洗、除去してスポンジ状とする方法である。セルロース類の多孔体の製造法の代表的な態様に、金型加熱法がある。すなわち、ビスコースに対し、補強繊維と、多孔化剤として結晶芒硝を添加混合し、得られた混合物を、所要形状の金型に流し込み、これを加熱凝固、加熱再生させた後、酸性水溶液と接触させて、セルロースを完全再生し、次いで水洗、乾燥することによって製造される。ビスコース混合物を凝固、再生させるための加熱温度は、90～100℃が一般的に採用され、その処理時間は2時間程度である。

【0010】ビスコースに添加する補強繊維としては、麻、パルプ解砕物、綿、レーヨンなどのセルロース繊維が使用される場合が多い。しかし、強度向上や疎水性向上を目的として、化学繊維を添加してもよい。補強繊維の太さ、長さ、特に制限はないが、繊維長が余りに長いものは、混合時に絡みついて、均一混合し難い。ビスコースに添加する補強繊維の量は、ビスコース中のセルロースに対し、1～50重量%である。

【0011】また、ビスコースに添加する結晶芒硝の平均粒径は、一般的には1～5mmであり、その添加量は、目的とする多孔体の密度に応じて、適宜決められ、

一般には、ビスコース中のセルロースに対し、15～70倍量となる量である。その添加量割合が多ければ、多孔体の密度は低下し、柔軟性は向上するが強度は低下する。一方、その添加割合が少なければ、多孔体の密度は高くなり、強度は大きくなるが、柔軟性は低下する。ビスコースに添加した結晶芒硝は、後続の水洗工程で多孔体から溶出除去される。一方、セルロース類の多孔体の平均孔径は、添加する結晶芒硝の粒径を変化させることによって、調節することが可能である。すなわち、大粒の芒硝を用いれば、平均孔径は大きくなり、微細粒の芒硝を用いれば、平均孔径は小さくなる。

【0012】セルロース類の多孔体の製造法の他の代表的な態様に、押出法がある。すなわち、この方法は、前記のごとく、ビスコースに対し、補強繊維と、多孔化剤として結晶芒硝を添加混合して得られる、ビスコース混合物を、ノズルから塩溶液中に押し出し成形し、再生し、その後水洗して、多孔体を連続的に得る方法である。連続製造できる点で、金型加熱法より生産性が高い。

【0013】また、セルロースにシアノエチル基等を導入した、すなわちセルロースの水酸基の水素をシアノエチル基等で置換した、セルロース誘導体の多孔体も、本発明に使用することができる。この種のセルロース誘導体の多孔体は、特願平6-54787号明細書に開示されたもので、本発明に好適である。このセルロース誘導体の多孔体は、ビスコースに補強繊維と結晶芒硝の他に、アクリロニトリルを添加した混合物を用いて製造される。アクリロニトリルを添加すること以外は、上記の2つの方法と同様に製造される。

【0014】シアノエチル化セルロースの多孔体において、シアノエチル基の導入量は、窒素分として0.1重量%以上、2重量%未満が、本発明に好適である。シアノエチル基の導入量が、多すぎるとセルロース類が一部水中に溶出し、水中での強度低下の原因となり、また少なすぎると後述のシアノエチル化の効果が期待できなくなり、好ましくない。また、このシアノエチル化セルロースの多孔体を、酸又はアルカリで処理して、シアノエチル基（ $-CH_2CH_2CN$ ）を加水分解し、その少なくとも一部をカルバモイルエチル基（ $-CH_2CH_2CONH_2$ ）、カルボキシエチル基（ $-CH_2CH_2COOH$ ）、及び／又はカルボキシエチル塩の基（ $-CH_2CH_2COOM$ 、但しMはアルカリ由来の基）とした、シアノエチル化セルロースの加水分解物の多孔体も、本発明に使用できる。

【0015】本発明に用いるセルロース類の多孔体として好ましいのは、上記のシアノエチル化セルロースの多孔体又はその加水分解物の多孔体のような、セルロース誘導体の多孔体であり、乾燥時の柔軟性、湿潤回復性及びカビや細菌に対する耐性が向上される。すなわち、このようなセルロース誘導体の多孔体は、誘導体の基を導

入していないセルロースの多孔体に比べると、吸水性がよく、生育がむらなく均一になり、培地として好ましい。また、カビの攻撃も受け難く、培養中に雑菌が入った場合でも、菌による生育抑制が緩和され、さらに順化の際に外に出したとき、カビによる根の生育抑制が緩和されるので好ましい。

【0016】本発明の培地として使用されるセルロース類の多孔体の形状は、特に限定されるものではなく、ブロック状でもよいし、粒状のものでもよい。茎を挿し増殖させる場合には、ブロック状のものに穴をあけたものの方が、挿す場所が決まってい、使い易い。カルスや不定芽の場合は、粒状の方が、培養体全体を埋め込むことができ有利である。粒径としては、特に制限されるものではないが、通常0.5～5mm程度が適当である。培地の使用量に関しては、適用する植物の種類に応じて異なり、一義的に決定することは、困難であるが、培養容器中の収容された培地の高さとして1～4cm程度にするのが標準である。

【0017】本発明においては、これらの培地に、無菌的に培養液を添加し、培養体を植え込み培養する。ここで培養体とは、高等植物の細胞培養や成長点培養においては、初代培養、継代培養を行い、早生分枝法プロトコーム様体法、苗条原基法等により形成せられた、小植物や多芽体を指している。培養する容器としては、一般に用いられるガラスやポリカーボネート製の容器で、特に制限されるものではない。

【0018】本発明の培地に添加する培養液としては、特に制限はなく、MS基本培地、ホワイート培地、ヘラー培地、ヴィシン&ヴェント培地等の呼称を持つ、植物組織培養に慣用の組成の培養液を使用することができる。培養液の添加量は、培地1g当り2.5～30mlの範囲が適当である。好ましくは、10～20mlである。培養液量が多すぎると、空気相が少なく過湿になり、発根が悪く、また植物体が水浸状（苗質が水っぽく、透き通った状態）となり、生育にとって不適である。培養液量が少なすぎると、培養期間中に乾燥してしまい、生育不良となり、好ましくない。

【0019】本発明の培地には、必要に応じさらに特別な養分、抗菌剤、着色剤、湿潤剤などの他の補助成分を添加することもできる。添加の時期は、セルロース類の多孔体を製造する際に、ビスコースに対して添加することもできるし、上記の培養液に、添加することもできるし、その他任意の段階で添加することが可能である。用いることのできる抗菌剤は、植物細胞の増殖に悪影響を与えないものであれば、特に限定されない。例として、アパタイト系抗菌剤、4級アンモニウム系抗菌剤などが挙げられる。

【0020】本発明のセルロース類の多孔体を支持体とする培地を用いることによって、根の成長がよく、植物体として極めて良好な状態となる。従って、順化時の成

長スピードが早く、歩留りも向上し、植物の種類にもよるが、直接培養土に移植することも可能となり、手間の削減が可能となる。本発明の培地は、使用後も土壤中で分解して、土壤養分となるので、残留培地が問題になる恐れもない。

【0021】

【実施例】以下、実施例により、本発明を詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0022】「製造例1」

（ビスコースの製造）パルプ原料として、針葉樹クラフトパルプを用いて、これを通常の方法で、アルカリ浸漬、圧搾、粉碎して、70℃で3時間老成した後、パルプ重量に対して35重量%の二硫化炭素を反応させ、セルロースザンテートを得た。このセルロースザンテートを水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、セルロース濃度9.0%、アルカリ濃度8.5%のビスコースを得た。このビスコースを20℃で10時間熟成して多孔体製造用ビスコースとした。

【0023】（多孔体製造用ビスコース混合物の製造）

上記ビスコース100重量部に、補強繊維として平均繊維長7mm、太さ1.5デニールのセルロース繊維0.9重量部を加え、平均粒径70μmの結晶芒硝10水塩を360重量部加えて、10分間、2軸ニーダーを用いて混練した。

【0024】（多孔体の製造）この原液を、縦10cm

×横10cm×高さ3cmの金型に流し込み、98℃で約2時間煮沸した。水洗後、1%酢酸水を用いて中和した後、水洗し、セルロースの多孔体を得た。得られた多孔体の、見掛け密度は0.095g/ml、平均孔径は230μmであった。

【0025】「製造例2」

（多孔体製造用ビスコース混合物の製造）製造例1のビスコース100重量部に、補強繊維として平均繊維長7mm、太さ1.5デニールのセルロース繊維0.9重量部を加え、さらに、0.88重量部のアクリロニトリルを添加し10分間混練した後、平均粒径70μmの結晶芒硝10水塩を360重量部加えて、10分間、2軸ニーダーを用いて混練した。

【0026】（多孔体の製造）この原液を、スクリュ

ーポンプを用いて、直径10mmの穴径を有するダイスから、30%塩化アンモニウム水溶液に押し出し、2分間滞留させ、紐状に成形した。得られた紐状成形体を、硫酸7重量%からなる再生溶液（70℃）に4分間浸漬した後、水洗し、さらに長さ0.5cmに切断して、シアノエチル化セルロースの多孔体を得た。得られた多孔体の見掛け密度は0.042g/ml、平均孔径は260μmであった。また、この多孔体のN含量は0.17重量%であった。

【0027】「実施例1」製造例1のセルロースの多孔

体0.5gを、直径2cm、高さ12cmのガラス試験管に入れ（培地の高さ約3cm）、これに培養液（MS基本培地、3%サッカロース、pH5.8）5mlを入れ、密封オートクレープし培養培地とした。

【0028】これに、サツマイモ無菌培養苗1節（約1cm）を挿し、25℃で1か月間培養した。培養1か月後、生育調査（草丈、葉数、生体重及び発根状態）を行った。さらに、その後バーミキュライトを詰めたポット

に移植し、生育状況を2週間観察した。これらの結果を表1に示した。比較として、セルロースの多孔体の代わりに、寒天（0.8%）を用いた例を、表1に併せて示した。なお、表中の発根状態については、+++を発根大（極めて良好）とし、++を発根普通（良好）とし、+を発根小（不良）とする、3段階評価で示した。

【0029】

【表1】

表 1

培地の種類	草丈 (cm)	葉数 (枚)	生体重 (mg/本)	発根 状態	移植後の 生育
(実施例) セルロースの 多孔体	2.0	3.5	0.40	+++	活着よく 生育良好
(比較例) 寒天	1.0	2.5	0.8	+	活着悪く 生育遅れる

【0030】実施例1の培養培地で培養した苗は、発根状態が極めて良好で、しっかりした苗ができ、移植後の生育も良好で優れていた。

【0031】「実施例2」製造例2の粒状シアノエチル化セルロースの多孔体5gを、縦6cm×横6cm×高さ10cmのポリカーボネート製容器に入れ（培地の高さ約2cm）、これに培養液（MS基本培地、3%サッカロース、0.02mg/l インドール酢酸、pH5.8）20mlを入れ、密封オートクレープ（高圧滅菌処理）し、培養培地とした。

【0032】これに、カーネーション無菌培養苗1節

（約1.5cm）を挿し、20℃で1か月間培養した。培養1か月後、生育調査（草丈、葉数、生体重、苗質及び発根状態）を行った。さらにその後、バーミキュライトを詰めたポットに移植し、生育状況を2週間観察した。これらの結果を表2に示した。比較として、シアノエチル化セルロースの多孔体の代わりに、寒天（0.8%）を用いた例及びロックウールを用いた例を、表2に併せて示した。

【0033】

【表2】

表 2

培地の種類	草丈 (cm)	葉数 (枚)	生体重 (mg/本)	発根 状態	苗質	移植後の 生育
(実施例) シアノエチル 化セルロース の多孔体	8.0	10	0.25	+++	良好	活着よく 生育良好
(比較例) 寒天	12.5	10	0.20	+	不可 (徒長)	枯死
ロックウール	6.0	8	0.25	±	良好	活着悪く 生育遅れ

【0034】実施例2の培養培地で培養した苗は、発根状態が極めて良好で、しっかりした苗ができ、移植後の生育も良好で優れていた。

【0035】「実施例3」製造例2の粒状シアノエチル化セルロースの多孔体5gを、縦6cm×横6cm×高さ10cmのポリカーボネート製容器に入れ（培地の高さ約2cm）、これに培養液（MS基本培地、3%サッカロース、0.5mg/l NAA、0.5mg/l BA、pH5.8）20mlを入れ、密封オートクレープ

し、培養培地とした。なお、NAAはナフタレン酢酸系植物ホルモンの略語であり、またBAはベンジルアデニン系植物ホルモンの略語である。

【0036】これに、キュウリ子葉より再生した無菌再生植物体（約2cm）を埋め込み、25℃で1か月間培養した。培養1か月後、生育調査（草丈、葉数、苗質及び発根状態）を行った。さらにその後、バーミキュライトを詰めたポットに移植し、生育状況を2週間観察した。これらの結果を表3に示した。比較として、シアノ

エチル化セルロースの多孔体の代わりに、寒天（0.8 %）を用いた例及びバーミキュライトを用いた例を、表3に併せて示した。

【0037】

【表3】

表 3

培地の種類	草丈 (cm)	葉数 (枚)	発根 状態	苗質	移植後の 生育
（実施例） シアノエチル 化セルロース の多孔体	8.0	6	+++	水浸状 軽減され良	生育良好
（比較例） 寒天	8.0	6	+	水浸状 激しく悪	生育やや不良 （遅延）
バーミキュラ イト	7.0	5	±	水浸状 激しく悪	生育やや不良 （遅延）

【0038】実施例3の培養培地で培養した苗は、発根状態が極めて良好で、しっかりした苗ができ、移植後の生育も良好で優れていた。

【0039】

【発明の効果】実施例の比較からも明らかなように、本発明の培地を用いて、植物組織培養を行った場合、従来の寒天やロックウールを用いた場合に比べ、生育や発根

が良く、順化時に良好な活着率を示し、歩留りも向上し、極めて有利である。さらに、これまで増殖発根段階、順化段階と別々2段階の培養が必要であったものが、1回で済むようになり、労力的にも極めて有利となる。また、使用后、土壤中分解する点でも、ロックウールに比べて、極めて有利である。